



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **05025058 A**(43) Date of publication of application: **02.02.93**

(51) Int. Cl.

A61K 39/395
A61K 47/10
(21) Application number: **03204743**(22) Date of filing: **20.07.91**(71) Applicant: **HAGIWARA YOSHIHIDE**
(72) Inventor: **HAGIWARA HIDEAKI**
YUASA HIDEO
YAMAMOTO YASUNORI
(54) **STABILIZED HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY PREPARATION**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain the title preparation substantially improved in stability, in particular, stability to the flocculation or precipitation in its redissolution after lyophilization by formulating human monoclonal antibody with a specified small amount of mannitol.

CONSTITUTION: D-mannitol as stabilizer is introduced into a human monoclonal antibody preparation by

dialysis, pref. after replacement with a buffer solution suitable for the preparation through gel filtration technique for preparation manufacturing. The D-mannitol content of the preparation is pref. 1-20 (esp. 5-15) mg per mg of the human monoclonal antibody in the preparation. Combination of glycine with the D-mannitol will further improve the preparation's stability. The amount of the glycine to be used is 0.005-0.2 (pref. 0.1-0.15) mol per mg of the human monoclonal antibody.

COPYRIGHT: (C)1993,JPO&Japio

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-25058

(43) 公開日 平成 5 年 (1993) 2 月 2 日

| (51) Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|---------------------------|------|---------|-----|--------|
| A 6 1 K 39/395 | M | 8413-4C | | |
| 47/10 | J | 7329-4C | | |

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全 4 頁)

| | | | |
|-----------|----------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願平3-204743 | (71) 出願人 | 000234074 萩原 義秀 兵庫県宝塚市平井山荘 4 番14号 |
| (22) 出願日 | 平成 3 年 (1991) 7 月20日 | (72) 発明者 | 萩原 秀昭 兵庫県宝塚市平井山荘 4-14 |
| | | (72) 発明者 | 湯浅 英雄 兵庫県加西市北条町古坂 3-79 |
| | | (72) 発明者 | 山本 泰範 兵庫県加西市北条町北条溝川53 第5 岩井 ハイツ721号室 |
| | | (74) 代理人 | 弁理士 小田島 平吉 (外 1 名) |

(54) 【発明の名称】 安定化されたヒトモノクローナル抗体製剤

(57) 【要約】

【構成】 ヒトモノクローナル抗体 1 mgあたり 1 ~ 2 0 mgのD-マンニトールを含有する安定化されたヒトモノクローナル抗体製剤。

【効果】 本製剤は溶液状態、凍結乾燥状態、凍結状態、殊に凍結乾燥後再溶解時のヒトモノクローナル抗体の凝集、沈殿に対する安定性に優れている。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトモノクローナル抗体1mgあたり1～20mgのD-マンニトールを含有することを特徴とする安定化されたヒトモノクローナル抗体製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】 本発明は安定化されたヒトモノクローナル抗体製剤に関し、さらに詳しくは、溶液状態、凍結乾燥状態、凍結状態における安定性、殊に、凍結乾燥の再溶解（復元）安定性に優れたヒトモノクローナル抗体製剤に関する。

【0002】 1975年にケーラーとミルスタインによりモノクローナル抗体を遺伝子工学的に産生する方法が提案されて [Koehler, G., Milstein, C, Nature 256, 495 (1975)] 以来、モノクローナル抗体が均質な抗体として大量に供給される道がひらかれ、医学、生物学の分野で広く利用されている。

【0003】 近年、ヒトモノクローナル抗体がヒト臨床試験に供されており、中でも抗腫瘍を目的とした医薬品分野で注目されている。しかし、精製されたヒトモノクローナル抗体は、溶液状態又は凍結乾燥後の再溶解（復元）時に凝集、沈殿しやすいという製剤上好ましくない性質があり、そのような望ましくない性質をもたない安定化されたモノクローナル抗体製剤の開発が望まれる。

【0004】 一方、抗体（免疫グロブリン）の安定化法として、従来、スルホン化免疫グロブリンに血清アルブミン又は血清アルブミンとグリシン及び／又はマンニトールを添加する方法（特公昭62-20965号公報）；比較的多量の多価アルコールを添加する方法（特開昭63-88197号公報）、デキストランを添加する方法（特開昭63-225320号公報）等が提案されている。しかしながら、これらの従来提案されている方法によつては、ヒトモノクローナル抗体製剤における前記の如き望ましくない性質を十分に改良することはできない。

【0005】 今回、本発明者らは、ヒトモノクローナル抗体に対して特定少量のマンニトールを配合することによつて、ヒトモノクローナル抗体製剤の安定性、殊に、ヒトモノクローナル抗体の凍結乾燥後再溶解する時の凝集、沈殿に対する安定性が著しく向上することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】 かくして、本発明によれば、ヒトモノクローナル抗体1mgあたり1～20mgのD-マンニトールを含有することを特徴とする安定化されたヒトモノクローナル抗体製剤が提供される。

【0007】 本発明に従つて安定化可能なヒトモノクローナル抗体には特に制限はなく、各種のヒトモノクローナル抗体を使用することができる。例えば、CLN-IgG、SLN-IgG、COLN-IgA、TOS/H8-IgM [萩原秀昭：BIOINDUSTRY, 4, 730 (1987)] 等を代表例として例示することが

できる。

【0008】 このようなヒトモノクローナル抗体は、医薬品等として実用化するために製剤化されるが、その製剤化の方法としては、例えば精製されたヒトモノクローナル抗体を必要に応じて限外濾過、硫酸分画等により濃縮し、ゲル濾過法により製剤に適した緩衝液と置換し、場合によつてはさらに濃度を調製した後、濾過滅菌処理を行ない、凍結乾燥する方法が挙げられる。

【0009】 本発明の安定化されたヒトモノクローナル抗体製剤を調製するにあつて、安定化剤としてのD-マンニトールは、上記製剤化の任意の段階で配合することができるが、一般には、ゲル濾過法により製剤に適した緩衝液と置換した後に透析法によつてヒトモノクローナル抗体製剤に導入するようにするのが好適である。D-マンニトールの含有量は、製剤中のヒトモノクローナル抗体1mgあたり1～20mg、好ましくは5～15mgの範囲内とすることができる。D-マンニトールの含有量が1mgより少ないと、所期とする十分な安定化効果が得られず、また20mgよりも多いと、逆に抗体の凝集がみられるようになる。

【0010】 さらに、D-マンニトールに加えてグリシンを併用することにより、製剤の安定性がさらに向上することが判明した。その際のグリシンの使用量は厳密に制限されないが、一般に、ヒトモノクローナル抗体1mgあたり0.005～0.2モル、好ましくは0.1～0.15モル範囲内が適当である。

【0011】 グリシンの本発明の製剤への導入は、D-マンニトールの導入と同時期に行なうことができる。

【0012】 本発明の製剤には、さらに必要に応じて、pHを調整するための適当量のリン酸塩等を配合することができる。

【0013】 次に実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

【0014】

【実施例】 参考例1：ヒトモノクローナル抗体の調製
抗体産性細胞（ヒト×ヒトハイブリドーマ＝CLN H11）の凍結細胞を融解し、基礎培地にて洗浄した後、10%ウシ胎児血清を含んだ基礎培地を用いて培養した。培養後、この培養液から細胞を分取し、無血清培地（Hybri-ty-I I、H I Hバイオセンター社製）にて再び培養を行った後、さらに同じ培地で回分培養にてスケールアップさせた。得られた無血清培養液40リットルから細胞を取り除き、限外濾過（PROSTAKTM、ミリポア社製）により、約5リットルまで濃縮した。

【0015】 これに硫酸アンモニウムを添加し、最終飽和溶液が70%になる様に塩析し、硫酸沈殿物を得た。

【0016】 この硫酸沈殿物を10mM燐酸緩衝液（以下PBとする）にて20リットル×2回、のべ24時間、透析を行った後、陽イオン交換カラム（S-Sepharose, fastflow, フアルマシア）に吸着させた。カラム吸着物

を10mM PBでよく洗浄後、10mM PB中、0から0.5M NaClの濃度勾配により溶出し、IgGの粗分画を得た。

【0017】これをProtein Aカラムに吸着させ、10mM PB+1M NaClでよく洗浄後、0.1Mグリシン-塩酸+1M NaCl (pH3.0)で溶出した。

【0018】得られたIgGを硫酸分画(飽和濃度50%)で濃縮し、10mM燐酸緩衝生理食塩水(以下PBSとする)で平衡化したSephacryl S-300カラムによりゲル濾過を行い、精製IgGとした。

【0019】参考例2:安定化剤等の調製

(1)リン酸緩衝生理食塩水(PBS)は、1.15gの Na_2HPO_4 (無水)、8.0gのNaCl、0.2gの KH_2PO_4 、0.2gのKClを約900mlの蒸留水に溶解後、pHを7.2-7.4に調整し、全量を1.0gとした。

【0020】(2)注射用生理食塩水は、(株)大塚製薬工場製を用いた。

【0021】(3)マンニトール溶液は、(株)大塚製品工場製の20%(w/v)D-マンニトール注射液を蒸留水にて、それぞれ1%、5%、10%の濃度に希釈した。

【0022】(4)1%マンニトール+注射用生理食塩水は、D-マンニトールを注射用生理食塩水にて1%(w/v)になるように溶解した。

【0023】(5)グリシン-マンニトール溶液は、グリシン22.5g、20%D-マンニトール溶液50ml、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.56gを約900mlの水に溶解し、pHを7.2-7.4に調整した。

*30 【表1】

| 安定化剤 | 1バイアル中の抗体量 (mg) | | | |
|-------------------|-----------------|-------|-------|-------|
| | 0 | 1.0 | 2.5 | 5.0 |
| PBS | 0.019 | 0.194 | 0.311 | 0.427 |
| 注射用生理食塩水 | 0.001 | 0.220 | 0.582 | 0.952 |
| 1%マンニトール | 0.001 | 0.014 | 0.035 | - |
| 5%マンニトール | 0.000 | 0.194 | 0.270 | - |
| 10%マンニトール | 0.001 | 0.246 | 0.317 | - |
| 1%マンニトール+注射用生理食塩水 | 0.001 | 0.193 | 0.228 | - |
| グリシン-マンニトール | 0.010 | 0.042 | - | 0.115 |

【0028】実施例2:ヒトモノクローナル抗体の凍結乾燥剤の調製及びその安定性(2)

実施例1に記載の方法に準じて、1バイアル中のD-マンニトールの量が1、2、5、10、15、20、50又は100mg及びモノクローナル抗体の量が1、2.5又は5mgを含む凍結乾燥剤を調製し、その溶解度を比較し

*【0024】実施例1:ヒトモノクローナル抗体の凍結乾燥剤の調製及びその安定性(1)

参考例2で作成した各々の溶液に対して参考例1で調製したヒトモノクローナル抗体溶液を透析した。得られた各々のヒトモノクローナル抗体溶液を1.0、2.5、5.0mg/mlの濃度に調整した。0.22 μm のメンブランフィルターを通し、1mlずつバイアルに分注した。アメリカ、ラプコンコ社製のトレードライヤーを用いて凍結乾燥を行った。凍結乾燥は、棚温-30℃でサンプルを凍結させるために約1時間置き、サンプルが完全に凍結した後、吸引ポンプを動かし、乾燥を開始した。棚温を0℃まで上昇させ約20時間後凍結乾燥を終了した。

【0025】各バイアルに1mlの蒸留水を加え、凍結乾燥粉末を溶解し、各々の溶解度を通常バクテリア等の培養液の濁度を測定する際に用いられるOD₆₀₀の値により比較した。抗体の凝集などの結果、不溶性粒子が生じた場合、OD₆₀₀の値は上昇する。その結果、下記表1に示すとおり、1%マンニトール溶液及びグリシン-マンニトール溶液が、ヒトモノクローナル抗体の凍結乾燥後の溶解度という点で最もすぐれていることがわかった。また、マンニトールのみの溶液でも5%、10%と濃度が高い溶液では溶解度は悪くなった。また、マンニトールの濃度が1%であっても、1%マンニトール+注射用生理食塩水の結果にみられるように、0.9%程度のNaClが存在すると溶解度が悪くなった。

【0026】表1. 各安定化剤におけるヒトモノクローナル抗体の凍結乾燥後の溶解度(OD₆₀₀)

【0027】

【表1】

た。その結果を表2に示す。

【0029】その結果、凍結乾燥後のD-マンニトール量が抗体1mgあたり1~20mgの範囲内にあれば、十分な溶解度が得られることがわかる。

【0030】表2. D-マンニトールにおけるヒトモノクローナル抗体の凍結乾燥後の溶解度

(OD₆₀₀)
【0031】

【表2】

| 1バイアル中の D-マンニトール の量(mg) | 1バイアル中の抗体量(mg) | | |
|-------------------------------|----------------|--------|-------|
| | 1 mg | 2.5 mg | 5 mg |
| 1 | 0.007 | 0.008 | 0.008 |
| 2 | 0.005 | 0.004 | 0.013 |
| 5 | 0.003 | 0.003 | 0.002 |
| 10 | 0.001 | 0.004 | 0.008 |
| 15 | 0.002 | 0.002 | 0.005 |
| 20 | 0.005 | 0.012 | 0.006 |
| 50 | 0.194 | 0.022 | 0.024 |
| 100 | 0.246 | 0.127 | 0.031 |